




PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61L 27/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/00152 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. Januar 1999 (07.01.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/01782 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. Juni 1998 (29.06.98) (30) Prioritätsdaten: 197 27 497.8 27. Juni 1997 (27.06.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: BADER, Augustinus [DE/DE]; Hinter den langen Höfen 16, D-31275 Immensen (DE). STEINHOFF, Gustav [DE/DE]; Heckendamm 12, D-31303 Burgdorf (DE). HAVERICH, Axel [DE/DE]; Dorfstrasse 8, D-30916 Isernhagen (DE). (74) Anwälte: LÄUFER, Martina usw.; Gramm, Lins & Partner GbR, Theodor-Heuss-Strasse 1, D-38122 Braunschweig (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: BIOSYNTHETIC TRANSPLANT AND METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF (54) Bezeichnung: BIOARTIFIZIELLES TRANSPLANTAT UND VERFAHREN ZU SEINER HERSTELLUNG <div data-bbox="418 1213 1302 1726"></div> (57) Abstract <p>The invention relates to a recipient-specific transplant consisting of interstitial tissue comprising various differentiated autologously or genetically engineered and modified quasi-autologously colonized cells. In order to produce said transplant, allogeneous or xenogeneic tissue or material is subjected to enzymatic or chemical treatment to obtain a non-denatured practically cell-free collagen matrix with a loosened structure, which can be as fully and directly re-colonized with the desired cells as possible. The transplant thus obtained can be used immediately.</p>		

Best Available Copy

(57) Zusammenfassung

Es wird ein empfängerspezifisches Transplantat vorgestellt, welches aus bereichsweise mit verschiedenen differenzierten autologen oder gentechnisch veränderten quasi-autologen besiedelten Zellen interstitiellem Bindegewebe besteht. Zur Herstellung eines solchen Transplantats wird ein allogenes oder xenogenes Gewebe bzw. Material enzymatisch oder chemisch so behandelt, daß eine nicht-denaturierte praktisch zellfreie Collagen-Matrix mit aufgelockerter Struktur erhalten wird, die mit den jeweils gewünschten Zellen direkt möglichst vollständig wiederbesiedelt wird. Das so erhaltene Transplantat ist unmittelbar einsetzbar.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbajdschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Bioartifizielles Transplantat und Verfahren zu seiner Herstellung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines bioartifiziellen Transplantats unter Verwendung einer zellfrei gemachten Bindegewebs-Matrix, die mit autologen Zellen des Transplantat-Empfängers oder mit gentechnisch modifizierten allogenen oder xenogenen Zellen besiedelt wurde. Ferner betrifft die Erfindung ein bioartifizielles empfängerspezifisches Transplantat, das nach dem genannten Verfahren erhältlich ist und aus bereichsweise mit verschiedenen differenzierten autologen Zellen besiedeltem interstitiellem Bindegewebe besteht.

In der Transplantationstechnik wird heute die Transplantation von Haut, Gefäßen und Organen chirurgisch bereits gut beherrscht und ist weit verbreitet. Die Bereitstellung geeigneter Transplantate ist jedoch noch immer schwierig. Die Transplantate kann man nach ihrer Art in drei große Gruppen einteilen. Zunächst gibt es Transplantate bzw. Implantate aus künstlichen Materialien, wie Kunststoffen, Metallen, Keramik, textilen Materialien usw. je nach Verwendung und dadurch sich ergebender Belastung.

Die synthetischen Implantate haben heute den Vorteil großer Haltbarkeit und sind besonders im orthopädischen Bereich durchgesetzt, da beispielsweise bei künstlichen Gelenken hohe Anforderungen an die Belastbarkeit des Materials gestellt werden. Künstliche Implantate haben jedoch vor allem den Nachteil, daß sie in keinem Falle mitwachsen und auch nicht wirklich einwachsen können. Durch letzteres entstehen häufig Probleme am Übergang vom künstlichen Implantat zu seiner natürlichen Umgebung.

Als zweites besteht die Möglichkeit, allogen Material, z.B. Spenderorgane, oder u.U. auch xenogenes Material (tierischen Ursprungs) zu verwenden. Chemisch behandelte Transplantate tierischer Herkunft werden beispielsweise für den Herzklappenersatz beim Menschen verwendet. Das tierische Material wird dabei i.a. mit Glutaraldehyd behandelt, um die Strukturproteine zu stabilisieren und eine antigene Reaktion zu verhindern. Das mit Glutaraldehyd behandelte Gewebe unterliegt jedoch einer stetigen Verhärtung und fortschreitenden Calcifizierung nach der Transplantation. Diese Transplantate müssen daher alle paar Jahre ersetzt werden. Bei der Verwendung allogener Materialien, wie z.B. Spenderorganen ist eine ständige für den Organismus des Empfängers belastende Immunsuppression notwendig. Dennoch kann es zu Abstoßungsreaktionen aufgrund verschiedener Prozesse im Körper kommen.

In manchen Fällen wird schließlich versucht, körpereigenes Gewebe für eine Transplantation an anderer Stelle zu verwenden. Diese Methode wird beispielsweise bei Bypass-Operationen angewendet, wobei eine Vene von einer anderen Körperstelle entnommen und im Herzbereich eingesetzt wird, um mangelnde Durchblutung dort auszugleichen.

Auch bei Hautverpflanzungen wird häufig eigene, an anderer Stelle entnommene Haut verwendet. Bei der Verpflanzung von Haut besteht das größte Problem darin, daß praktische nichts gewonnen wird, wenn die Hautfläche 1:1 verpflanzt wird, und daß demzufolge ein kleiner Hautbereich entnommen und anschließend expandiert werden muß. Diese Dehnung der entnommenen Haut ist jedoch für die Stabilität und Funktionalität der neu transplantierten Haut schädlich.

Es besteht daher ein großes Bedürfnis für Transplantat-Materialien oder fertig verwendbare Transplantate, die dem natürlichen Material soweit nachmodelliert sind, daß sie gut einwachsen, nach Möglichkeit zu keinen Abstoßungsreaktionen ("Host-Versus-Graft-reaction") führen, dadurch lange haltbar sind und vom Wirt wie körpereigenes Material aufgefaßt und im

Rahmen des natürlichen Zellaustausches umgebaut werden, so daß möglichst sogar ein Mitwachsen der Transplantate im Körper des Empfängers ermöglicht wird.

- 5 Der Erfindung liegt daher die Problemstellung zugrunde, ein solches Transplantat und ein Verfahren zu seiner Herstellung zur Verfügung zu stellen.

10 Zur Lösung dieses Problems ist erfindungsgemäß ein Verfahren zur Herstellung eines bioartifiziellen Transplantats für einen ausgewählten Empfänger vorgesehen, welches die folgenden Schritte umfaßt:

- 15 a) Bereitstellung eines nativen, eine Collagen-Matrix enthaltenden allogenen oder xenogenen Gewebes bzw. Materials,
- 20 b) Entfernung weitgehend aller antigen-reaktiver Zellen aus der Collagen-Matrix durch schonende Zellentfernung und anschließendes Spülen mit steriler wässriger Lösung, wodurch eine chemisch nicht modifizierte, praktisch zellfrei gemachte, aufgelockerte Collagen-Matrix erhalten wird,
- 25 c) direkte Weiterverarbeitung des zellfrei gemachten, durch die Behandlung unter b) aufgelockerten Materials durch möglichst vollständige Besiedlung mit den jeweils gewünschten, autologen Zellen des Empfängers oder mit genetisch modifizierten für den Empfänger angepaßten Zellen, wodurch ein unmittelbar einsetzbares Transplantat erhalten wird.

30

Aus der US-PS 5 336 616 ist bereits ein Verfahren zur Zubereitung eines Gewebes auf Collagen-Basis für die Transplantation bekannt, welches mit Hilfe der Schritte: chemische Vorbehandlung und Zellentfernung, Kryobehandlung, Trockenstabilisierung, 35 Trocknung, Rehydrierung und Zellrekonstitution ein bioartifizielles Transplantat mit folgenden Eigenschaften ermöglichen soll: a) es enthält eine extrazelluläre Protein- und Collagen-Matrix, die möglicherweise vom Wirt remodelliert und repariert

werden kann, b) es stellt eine intakte Membran-Grundlage für die erfolgreiche Wiederbesiedlung mit lebensfähigen Endothel- oder Epithelzellen dar, c) es ruft primär keine Immunantwort beim Wirt hervor, d) es calzifiziert nicht und e) es kann einfach bei Raumtemperatur gelagert und transportiert werden. Das bekannte Verfahren beruht auf dem Konzept, daß als Transplantat eine möglichst "immun-neutrale" Stützgewebs-Matrix gebildet werden soll, die dann vom Transplantations-Empfänger im Körper umgebaut und remodelliert werden kann. Zur Erleichterung dieses Vorgangs ist auch die Möglichkeit anschließender Besiedlung des nach dem Verfahren hergestellten Transplantates vorgesehen.

Um zu vermeiden, daß die Matrix vom Körper des Transplantat-Empfängers als fremd erkannt wird, ist eine Präparation mit bestimmten Schritten vorgesehen. Zunächst wird das entnommene biologische Grundmaterial in eine Stabilisierungslösung eingelegt, um Strukturschäden zu vermeiden. Diese Stabilisierungslösung kann Antioxidantien, Quellmittel, Antibiotika, Protease-Inhibitoren und auch Relaxantien für glatte Muskulatur enthalten. Dann wird das vorbehandelte Gewebe in eine Azellularisierungslösung eingelegt, die im allgemeinen einen geeigneten Puffer, Salz, ein Antibiotikum, ein oder mehrere Detergentien, ein oder mehrere Protease-Inhibitoren und ein oder mehrere Enzyme enthält. Die so erhaltene azelluläre Matrix könnte nun mit einem vernetzenden Mittel, wie Glutaraldehyd, fixiert und bis zur Transplantation gelagert werden. Ansonsten wird sie einer üblichen Kryobehandlung unterzogen. Im Laufe dieser Kryobehandlung kann das Produkt bereits steril verpackt werden. Das Gewebe wird dann bei niedriger Temperatur unter Vakuumbedingungen einer möglichst schonenden Gefriertrocknung unterzogen. Diese Gefriertrocknung erfolgt offenbar als zusätzliche Maßnahme zur Vermeidung von Rejektionen, da angeblich gefriergetrocknetes Material verglichen mit frischem oder cryokonserviertem Material weniger Rejektionen verursacht. Das Material soll dann vorzugsweise in diesem Zustand gelagert und transportiert werden. Vor einer Transplantation wird das Gewebe rehydriert. Die Rehydrierung kann in Salz- oder Ringer-Lösung erfolgen und ggf. Protease-Inhibitor(en) enthalten. Weitere Zusatzstoffe können

enthalten sein, z.B. Diphosphonate zur Inhibierung alkaliner Phosphatase und Unterdrückung der Calcifizierung, weiterhin Mittel zur Anregung der Neovaskularisierung und Wirtszellen-Infiltration nach der Transplantation, oder die Rehydrierung

5 kann auch in einem Vernetzungsmittel wie Glutaraldehyd durchgeführt werden. Als zusätzliche Maßnahme ist schließlich die Besiedlung mit immuntoleranten lebensfähigen Zellen in vitro oder in vivo (nach der Transplantation) vorgesehen.

10 Das zentrale Konzept dieses bekannten Verfahrens besteht darin, eine azelluläre, quasi "neutrale" Matrix zu erhalten, die gut eingebaut wird und keine Rejektionen hervorruft. Die Betonung liegt dabei auf einer "Neutralisierung" der Matrix durch unter Umständen zahlreiche chemische Behandlungsschritte mit Enzymen,
15 Detergentien, Antibiotika, Protease-Inhibitoren usw.. Ein weiterer Schwerpunkt liegt auf der guten Lager- und Transportfähigkeit, die durch die Cryokonservierung und Trocknung erreicht wird, wobei gleichzeitig eine weitere "Neutralisierung" der Matrix stattfinden soll.

20 Das bekannte Verfahren - und damit auch das danach erhaltene Transplantat - weist jedoch noch gravierende Nachteile auf. So hat es sich gezeigt, daß die polymere Collagenmatrix auch bei schonendem Einfrieren und Trocknen Strukturveränderungen unter
25 Reduzierung der mechanischen Stabilität und Elastizität erleiden muß, da in vitro-Versuche zeigen, daß die Zellen bei einer Wiederbesiedlung auf einer vorher getrockneten oder cryobehandelten Collagen-Matrix wesentlich schlechter wieder einwachsen. Die Möglichkeit einer Renaturalisierung des Transplantats im
30 Empfängerkörper wird dadurch sehr behindert oder gegebenenfalls zunichte gemacht.

Ferner erscheint der Weg bedenklich, eine freiliegende "neutralisierte" Collagen-Matrix zu schaffen. Die Collagen-
35 Matrix kann zwar in vitro mit zahlreichen Chemikalien behandelt werden, dies läßt sich jedoch im Körper des Empfängers nicht weiterführen. Eine Behandlung mit Glutaraldehyd wird zu den oben bei xenogenen Materialien schon beschriebenen Problemen

zunehmender Verhärtung und evtl. doch zu einer Calzifizierung führen. Ferner besteht die Gefahr, daß eine freiliegende Collagen-Matrix letztendlich doch durch endogene Collagenasen angegriffen wird, so daß es zu Abstoßungsreaktionen kommen kann.

5 Bei freiliegender, unvollständig oder falsch besiedelter Collagen-Matrix kann es zu vermehrter Granulozyteneinwanderung und zu einer Thrombozyten-Adhäsion und Leukozyten-Einwanderung kommen, wodurch schließlich eine Entzündungsreaktion entsteht und das Transplantat strukturell und funktionell verändert wird.

10

Die Erfindung verfolgt demgegenüber ein neues Konzept. Großer Wert wird auch hier auf die vollständige Azellularisierung, d.h. die vollständige Entfernung antigen-reaktiver Zellen und anderer antigenen Gewebekomponenten aus der Zellmatrix gelegt.

15 Die Collagen-Matrix wird dann jedoch nicht in weiteren Behandlungsschritten immunologisch "neutralisiert" oder in ihrer Struktur verändert.

20

Als Ausgangsmaterial dient bei der Erfindung ein allogenes oder xenogenes Material, das die Grundstruktur für das gewünschte Gewebe, Gefäß oder Organ zur Verfügung stellen soll. Im Einzelfall könnte hier auch ein autologes Material verwendet werden, das dem späteren Transplantat-Empfänger zuvor entnommen wurde. Erfindungsgemäß soll die Azellularisierung dieses Ausgangsmaterials ausschließlich durch schonende Zellentfernung und anschließendes, ggf. reichliches Spülen mit steriler wässriger Lösung erfolgen. Die schonende Zellentfernung kann entweder durch schonende enzymatische Zellverdauung, beispielsweise durch Einlegen des Gewebes bzw. Materials in Trypsin-Lösung, erfolgen oder alternativ mit Hilfe eines chemisch zellablösenden Mittels, vorzugsweise mit Hilfe eines ionenspezifischen Komplexbildners.

25

30

Im Falle der enzymatischen Zellablösung werden durch das Verdauungsenzym Bindungsstellen in der Verankerung der Zellen mit ihrer Umgebung gelöst. Dies geschieht vorzugsweise durch Einlegen des Gewebes bzw. Materials in Trypsin-Lösung. Dieser Trypsin-Lösung kann bei Bedarf EDTA, EGTA, Triton oder TNN zuge-

35

setzt sein. Durch Einstellung der Zeitdauer, während derer das Enzym auf das Gewebe einwirkt, wird das Maß der Abverdauung gesteuert und es wird vermieden, daß ein Angriff auf die Collagen-Matrix selbst erfolgt. Die Trypsinbehandlung bewirkt auch
5 eine gute Auflockerung der zellfrei gemachten Matrix, so daß die Neubesiedlung erleichtert wird.

Alternativ wird ein chemisch zellablösendes Mittel verwendet, das auf beliebige andere chemische Weise die Zellen an ihrer
10 Verankerung zur Collagen-Matrix löst. Vorzugsweise ist vorgesehen, daß ein ionenspezifischer Komplexbildner verwendet wird, der den Zellen essentielle Ionen entzieht und so eine Ablösung verursacht. Durch die Komplexierung z.B. von Calciumionen wird die Bindung der Zellen untereinander und die Zell-Matrixbindung
15 über Integrine aufgehoben.

Als ionenspezifischer Komplexbildner kann beispielsweise das calziumspezifische EGTA (Ethylenglykol- bis-(2-aminoethyl-
ether)-tetraessigsäure) eingesetzt werden. EGTA wird vorzugs-
20 weise kurzzeitig und hochkonzentriert eingesetzt. Auch andere Komplex- bzw. Chelatbildner, wie EDTA (Ethylendiamintetra-
essigsäure), Citrat oder Ethylendiamin oder sonstige chemisch zellabtötende und ablösende Mittel, die die Collagen-
Proteinstruktur nicht angreifen, können verwendet werden. So
25 bieten sich weiterhin an : BAPTA/AM (ein zellpermeabler Calzium-Chelator) DMSO, Gadolinium, Desferrioxamin, Desferrithiocin, Hexadentat oder auch Aminocarboxylat.

Die vorgenannten Mittel können einzeln oder in Mischungen eingesetzt werden, sie können durch andere Zusätze ergänzt werden, wie z.B. durch Tenside, die die Ablösung der Zellen erleichtern können (z.B. TRITON®). Vorzugsweise ist das chemisch zellablö-
sende Mittel frei von Enzymen, die bei längerer Einwirkung Collagen angreifen könnten, wie z.B. Trypsin. Durch die genannten
35 Mittel werden die Zellen gleichzeitig abgetötet und abgelöst. Das Ablösen kann durch intensives Spülen oder eine entsprechende, die Zellen mechanisch abscherende Behandlung unterstützt werden

Ein Vorteil der chemisch-mechanischen Behandlung liegt darin, daß der Behandlungsschritt, in dem die Collagen-Matrix zellfrei gemacht wird, nur deutlich weniger Zeit in Anspruch zu nehmen
5 braucht als bei einer Behandlung mit Trypsin. Hierdurch sinkt erstens die Gefahr, daß die Collagen-Matrix selbst angegriffen wird, und zweitens bleibt die Tertiärstruktur besser erhalten, wenn das Substrat nicht zu lange in Lösung gequollen wird. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß durch den Einsatz "harter
10 Chemikalien" Probleme durch u.U. kontaminierte Enzyme tierischen Ursprungs vermieden werden können. Ein weiterer Vorteil liegt schließlich darin, daß die Basalmembran intakt bleibt. Die Basalmembran stellt das direkte und gewebespezifische Adhäsionssubstrat für die Endothelzellen dar. Der Glycosilierungs-
15 grad der Matrixproteine beeinflußt auch die Zellmigration und somit ein späteres Einwandern von Zellen. Die natürliche Form des Collagengerüsts in ihrer dreidimensionalen Verbindung mit anderen Matrixkomponenten und Integrinen kann daher durch die Erfindung erhalten werden.

20 Auf die beschriebene Weise wird eine aufgelockerte, jedoch in ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur dem nativen polymerisierten Collagen noch weitgehend entsprechende Collagenstruktur erhalten, die für das Einwachsen neuer Zellen, nämlich autologer
25 Zellen des Empfängers oder, falls dies im Einzelfall möglich ist, anderer immuntoleranter Zellen bestens vorbereitet ist.

Die zellfrei gemachte, aufgelockerte Matrix wird daher allenfalls kurz zwischengelagert oder sterilisiert (beispielsweise
30 radioaktiv mit UV oder Protonen bestrahlt, oder mit Ethylenoxid begast), jedoch nicht chemisch weiterbehandet, sondern prinzipiell sofort, möglichst vollständig mit den jeweils gewünschten, i.a. mit für den Empfänger autologen Zellen in vitro besiedelt. Diese Besiedlung kann in einem normalen Kulturmedium
35 erfolgen, dem ein Antibiotikum zugesetzt sein kann. Im Falle der besonders schonenden und schnell verlaufenden Zellablösung durch Komplexbildner kann ggf. Eine zusätzliche chemische oder

Kryo-Behandlung erfolgen, wenn dies aus besonderen Gründen notwendig erscheint.

Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, daß eine spätere
5 Abstoßungsreaktion erfolgreich bereits dadurch vermieden werden kann, daß eine vollständige, im Einzelfall auch mehrschichtige Besiedlung der weitestgehend azellularisierten Matrix mit immuntoleranten Zellen, d.h. im allgemeinen mit autologen Zellen des Empfängers, vorgenommen wird. Statt autologer Zellen können
10 auch Zellen anderen Ursprungs verwendet werden, die genetisch so verändert wurden, daß sie für den Transplantat-Empfänger "verträglich" sind, d.h., vom Körper nicht mehr als "fremd" erkannt werden. Auf diese Weise wird dem Empfänger ein Transplantat zur Verfügung gestellt, das an allen zugänglichen Stellen
15 mit autologen Zellen bedeckt ist und daher vom Körper des Empfängers nicht als fremd erkannt werden wird. Dieses Transplantat wird im Körper den üblichen Umbildungsmechanismen unterworfen werden, so daß es auf natürliche Weise remodelliert, erneuert und unter Zelldifferenzierung weiter angepaßt wird. Das
20 Transplantat ist daher bestens vorbereitet, besonders gut einzuwachsen, umgebaut zu werden und ggf. sogar mitzuwachsen. Durch die azellularisierte Matrix kann eine Vielzahl von Transplantatformen vorgegeben werden. Diese können je nach Anwendungszweck mit verschiedenen autologen Zellen besiedelt werden,
25 und zwar ggf. auch bereichsweise mit unterschiedlichen autologen Zellen.

In Weiterbildung der Erfindung ist vorgesehen, daß in die Matrix Wachstumsfaktoren mit eingebracht werden. Hierbei kann es
30 sich vorzugsweise um für die jeweiligen Zellen spezifische Faktoren, wie HGF, VEGF, FGF, ECGF oder PDGF handeln. Ebenso können auch Matrixfaktoren wie z.B. Fibronectin oder chemotaktische Faktoren eingesetzt werden.

35 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Wachstumsfaktoren bei der Zellbesiedlung eingebracht, indem genetisch modifizierte Zellen verwendet werden, die mit Genen für geeignete Wachstumsfaktoren transformiert wurden, so daß eine wenigstens

transiente Expression an Wachstumsfaktor(en) im Zeitraum nach der Transplantation erfolgt. Die temporäre Expression von Wachstumsfaktor(en) kann helfen, die Akzeptanz für das Transplantat zu erhöhen, indem Kapillarisationsprozesse verstärkt
5 oder ausgelöst werden. Für die Transformation bzw. Transfektion der Zellen ist eine geeignete Methode auszuwählen. Es kann sich dabei um die Elektroporation, liposomalen Gentransfer, rezeptorvermittelte Endozytose, Proteincoating oder sonst ein geeignetes der bekannten und in der Literatur hinlänglich beschriebenen Verfahren handeln.
10

Alternativ kann der Wachstumsfaktor auch direkt in die extrazelluläre Matrix eingebracht werden. Dies könnte beispielsweise in mikroinkapsulierter Form oder durch geeignete Beschichtung
15 geschehen. Hierdurch sollte der Wachstumsfaktor kurzfristig oder über einen bestimmten Zeitraum ab Implantation retardiert in dem Transplantat freigesetzt werden, so daß zeitweise eine örtlich hohe Konzentration an Wachstumsfaktor erzeugt wird, von der eine Signalwirkung für die Auslösung von Kapillarisationsprozessen ausgeht.
20

Das nach dem Verfahren erhaltene Transplantat ist unmittelbar einsetzbar. Lagerung und Transport sollte höchst schonend unter sterilen und nicht dehydrierenden Bedingungen erfolgen. Eine
25 gesonderte De- und Rehydrierung oder sonstige strukturverändernde Maßnahmen empfehlen sich an dem fertigen Transplantat nicht.

Insbesondere bei pareanchymatösen Organen ist die Steuerung,
30 welche Zellen wo aufwachsen sollen, besonders wichtig, damit das Gewebe nicht als fremd erkannt wird. Bei röhrenförmigen Gefäßen und Herzklappen-Transplantaten werden zweckmäßigerweise außen autologe (Myo-)Fibroblasten und innen Endothelzellen verwendet. Die Fibroblasten wachsen mehrschichtig auf und sichern
35 auf diese Weise eine äußerlich intakte Besiedlung mit autologen Zellen, wodurch die Infiltration mit Granulationsgewebe ver- oder zumindest stark gehindert wird. Das Aufbringen der Zellen auf die Außenseite röhrenförmiger Gefäße kann z.B. mit Hilfe

viskoser Flüssigkeiten erfolgen. Die Zellen halten sich dadurch besser auf der äußeren Oberfläche, so daß das Einwachsen erleichtert wird. Es kann eine viskose oder sogar gelierfähige Lösung Verwendung finden, die z.B. Collagen, Plasma oder Fibrinogen enthalten kann.

Die Erfindung umfaßt dementsprechend insbesondere auch bioartifizielle empfängerspezifische Transplantate, welche aus reichsweise mit verschiedenen differenzierten autologen Zellen besiedeltem interstitiellem Bindegewebe bestehen. Anstelle von autologen Zellen, die vorher vom Transplantat-Empfänger gewonnen wurden, können auch quasi-autologe Zellen anderen Ursprungs eingesetzt werden, die gentechnisch im Hinblick auf den Empfänger verändert wurden. Die Collagen-Matrix des interstitiellen Bindegewebes soll nach Möglichkeit nirgends mehr freiliegen.

Handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Transplantat um ein Haut-Transplantat, ist es vorzugsweise außen (auf der körperabgewandten Seite) mit Keratinozyten und innen (körperseitig) mit Zellen mesodermalen Ursprungs besiedelt. Auch hierbei sind die Oberflächen jeweils vollständig besiedelt, so daß dort überwiegend keine Collagen-Matrix freiliegt, die auf die Dauer verhärten oder vom Körper als fremd erkannt und deshalb bekämpft werden könnte.

Neben Hauttransplantaten können auch bioartifizielle Herzklappen, Aorten, sonstige Gefäße, Sehnen, Cornea, Knorpel, Knochen, Larynx, Herz, Trachea, Nerven, Miniskus, Diskus intervertebralis oder z.B. Ureteren, Urethra und Blase erhalten werden. Letztere können zur Defektdeckung bei Patienten nach Operationen oder bei angeborenen Mißbildungen (z.B. Hypospadie) verwendet werden.

Das polymerisierte, praktisch im nativen Zustand belassene Collagen der Transplantat-Matrix ist von einer dem natürlichen Zustand weitgehend entsprechenden hohen mechanischen Stabilität und Elastizität. Dies ermöglicht, daß das bioartifizielle Transplantat lange, möglicherweise dauerhaft, ohne erneuten

operativen Ersatz im Körper des Empfängers verbleiben kann. Darüberhinaus beeinflusst dieses Collagen die Zelldifferenzierung beim körpereigenen Umbau positiv. Das transplantierte artifizielle Organ wird leichter durch "inneren Umbau" körpereigen gemacht, d.h. daß die autologen Zellen die xenogene Matrix innerhalb des Organismus resorbieren und durch neue autologe Matrix ersetzen.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen beschrieben, die Isolationsprotokolle für die Isolation autologer Zellen und Beispiele für die Durchführung des Verfahrens umfassen.

Beispiele:

Herstellung eines bioartifiziellen Transplantats (allgemein)

Gewebevorbereitung (Zellentfernung) mit Trypsin:

Das Gewebe wird nach der Entnahme in eine bevorzugt 0,05%ige Trypsinlösung gelegt und dort je nach Wandstärke des Materials z.B. 24, 48, 72 oder 96 Stunden belassen. Alternativ kann statt der Zeit die Konzentration der Trypsin-Lösung variiert werden. Das Gewebe soll vollständig mit Trypsinlösung bedeckt sein. Die Flüssigkeit wird vorzugsweise ständig durch Rühren in Bewegung gehalten. Die Temperatur sollte zwischen 25 und 37°C liegen.

Insbesondere bei sehr festem Gewebe kann zur Unterstützung der Zellablösung zusätzlich eine Veränderung des pH-Wertes oder eine schonende Ultraschall-Behandlung vorgenommen werden.

Gewebevorbereitung (Zellentfernung) mit Komplex- bzw. Chelatbildner:

Typischerweise erfolgt die Behandlung des Gewebes durch Immersion in einer 1% EDTA isotonischen Kochsalzlösung bei 4°C für ca. 3 Stunden. Die Behandlungsdauer ist von der Konzentration des Komplexbildners abhängig. Bedarfsweise kann auch hier eine Unterstützung der Ablösung, beispielsweise durch Ultraschall, erfolgen.

Nach Abschluß der enzymatischen oder komplexierenden Ablösung von Zellen und antigenen Gewebeteilchen wird das Gewebe gespült d.h. mehrfach in Spüllösung eingelegt oder längere Zeit unter Durchfluß von Spüllösung gereinigt. Zum Spülen kann sterile wässrige Lösung wie z.B. NaCl-Lösung, PBS oder andere verwendet werden. Das Spülen kann mehrere Tage dauern und führt zusätzlich zu einer Entfernung vormals nicht abgeschwemmter Zellkörper.

Wenn die Behandlung mit Komplexbildner bei 4°C vorgenommen wurde, kann auch das Spülen vorteilhaft bei dieser Temperatur erfolgen. Dabei sollte wenigstens ca. 2 Stunden gespült werden.

Falls erforderlich, wird das Gewebe nun in isotonischer Lösung bei Kühlung auf etwa 4°C unter Zusatz von Antibiotika bis zur weiteren Besiedlung steril gelagert.

An dieser Stelle ist eine radioaktive Bestrahlung, beispielsweise eine γ -Sterilisierung, eine Begasung mit Ethylenoxid, eine UV- oder Protonenbestrahlung möglich.

Bei der Isolation der für die Besiedlung zu verwendenden Zellen (z.B. Endothelien glatte Muskelzellen, Fibroblasten) können konventionelle Isolationsprotokolle verwendet werden.

Die Besiedlung erfolgt bei 37°C unter Sterilbedingungen in einem Medium, dem ggf. Wachstumsfaktor (ECGF) zugesetzt sein kann. Für eine vollständige Besiedlung ist es vorteilhaft, daß Kulturmedium ständig zu bewegen und das bewegte Material häufig mit Sauerstoff in Kontakt zu bringen.

Die Besiedlung mit verschiedenartigen Zellen bzw. Zellpopulationen kann auf unterschiedliche Weise erfolgen.

Ein Vorteil der Erfindung ist, daß die Zellen eine extrazelluläre Matrix in einer weitestgehend der natürlichen Zusammensetzung entsprechenden Form und 3-D-Geometrie vorfinden. Das

heißt, daß unter Vermeidung strukturschädlicher Prozesse, wie z.B. Dehydrierung und Rehydrierung, eine dem physiologischen Zustand nahekommende extrazelluläre Matrix für die Zellbesiedlung verwendet werden kann. Diese Matrix kann zeitlich gestaffelt besiedelt werden.

Sofern es sich um Haut handelt, kann das Gewebe zwischenzeitlich auf einem Träger fixiert oder in einem Rahmen eingespannt werden, wonach dann nur die eine Seite mit Zellen gespült wird. Dieses Verfahren kann für die Ober- und Unterseite angewendet werden.

Auch andere Materialien können durch geeignetes Einspannen und/oder Abdichten bestimmter Bereiche gezielt besiedelt werden. Beispielsweise kann von oben mit Keratinozyten und von unten mit Bindegewebszellen und ggf. Zellen von Hautanhangsgebilden besiedelt werden. Alternativ können von oben zeitlich vor der Besiedlung mit Keratinozyten Zellen von Hautanhangsgebilden aufgegeben werden.

Röhrenförmige Transplantate können z.B. zunächst innen im Durchfluß besiedelt werden, dann abgebunden oder eingespannt und außen besiedelt werden.

Bei der Herstellung eines bioartifiziellen Gefäßes ist es beispielsweise möglich, von außen Myofibroblasten und innerhalb des Lumens humane Endothelien aufzugeben. Ziel ist es, das Einwachsen der Zellen in die Wand des Gefäßes und eine Differenzierung der Zellen am Migrationsziel innerhalb der 3D-Mikroumgebung der extrazellulären Matrix zu erreichen. Diese Einwanderung der Zellen in die Matrix stellt ein wesentliches Merkmal und gleichzeitig einen bedeutenden Vorteil der Erfindung dar.

Die Gefäßbesiedlung von außen kann auch zunächst mit glatten Muskelzellen und danach mit (Myo-)Fibroblasten erfolgen.

Alternativ können innen, in das Lumen, zunächst Myofibroblasten gegeben werden und danach - zeitlich so versetzt, daß sich eine konfluente Myofibroblasten-Zellschicht gebildet hat - ebenfalls in das Lumen Endothelien (in Kulturmedium suspendiert).

5

Die Gewinnung der Endothelien und glatten Muskelzellen wird entsprechend dem Stand der Technik durchgeführt.

GEWEBEGWINNUNG

10

Vena saphena-Stücke des peripheren Beins von Patienten von ca. 1 cm Länge werden in heparinisiertes Vollblut gegeben und auf diese Weise in das Labor transportiert. Dort erfolgt die Isolation der Endothelien und Myofibroblasten für die weitere Expansion in vitro.

15

ISOLATION UND KULTUR VON ENDOTHELIIEN, GLATTEN MUSKELZELLEN UND FIBROBLASTEN

20 1. Materialien

- HBSS (Clintec, Salvia, Homburg)
- PBS, darin Ca^{2+} und Mg^{2+} (Sigma)
- Collagenase A (Boehringer Mannheim)
- 25 • M-199 mit L-Glutamin (Sigma) , darin 10% (20%) FBS (Sigma)
- gepooltes Humanserum
- 100 u/ml Penicillin (Sigma), 100 µg/ml Streptomycin (Sigma)
- 5000 u/ml Heparin (Heparin Novo, Nordisk, Mainz, frei von Konservierungsstoffen)
- 30 • 6-well Kulturplatten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
- Fibronectin Beschichtung

2. Endothelzellen

35 2.1. Beispiel für eine Zellgewinnung

Die Zellgewinnung erfolgt durch Füllen des Segments mit PBS, darin Ca^{2+} und Mg^{2+} (Sigma) und 0,2% Collagenase A (Boehringer,

Mannheim) (alternativ HBSS oder M-199 mit 0,2% Collagenase A), 30 min Inkubieren in HBSS (5% CO₂/95% Luft/37°C), evtl. Verlängerung der Inkubationszeit auf 1h, Fushen mit 50 ml M-199 mit L-Glutamin (Sigma), darin 20% FBS (Sigma) (alternativ: Aufschneiden des Gefäßes und Abschaben der Zellen in einer mit Medium gefüllten Petrischale), Auffangen der Zellen und Zentrifugieren (10 min bei 300 xg), Resuspendieren in 5 ml M-199, darin 20% FKS, 10u/ml Penicillin (Sigma), 100µg/ml Streptomycin (Sigma), 50µg/ml EGF (endothelial growth factor) (Boehringer, Mannheim), 5000 u/ml Heparin und Kultivieren auf mit 1%iger Gelatine vorbeschichteten 6-well Kulturplatten. Alternativ kann anstelle von Humanserum auch FBS oder NCS verwendet werden.

2.2 Kultur von Endothelzellen

Die Kultur kann erfolgen durch: Inkubation bei 5% CO₂, 95% Luft bei 37°C unter Mediumwechsel alle 3 Tage. Nach Erreichen der Konfluenz wird zur Ablösung der Zellen eine Lösung mit 0,05% Trypsin und 0,02 % EDTA (Sigma) in PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ verwendet (Inkubation 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur). Alternativ kann eine mechanische Trennung durch "Abschaben" erfolgen. Anschließend wird M-199, darin 20% FBS (zur Trypsininaktivierung) gewaschen. Es wird 10 min bei 300 x g zentrifugiert und anschließend resuspendiert. Schließlich wird in 75cm²-Kultuflaschen subkultiviert (1. Passage, 2. Passage in 175cm²-Flaschen über ca. 2 Wochen). Diese Zellen werden zur Aussaat auf das Transplantat verwendet.

3. Myofibroblasten

3.1. Gewinnung von SMC ("smooth muscle cells" = glatte Muskelzellen) und FB (fibroblasts, Fibroblasten)

Die Gewinnung erfolgt in folgenden Schritten:

- mechanische Abtrennung der Adventitia (FB) vom deendothelialisierten Gefäß
- Zerkleinerung in 1mm-Stücke

- die Stücke werden mit wenig Medium in eine Kulturflasche gegeben
- nach 2-3 Tagen kleben die Gewebeteile auf dem Flaschenboden
- die Kulturflaschen werden täglich für 8 h senkrecht gestellt.

5

3.2 Kultivierung von SMC und FB

Die Kultivierung erfolgt mit einer Zelldichte von 10000 Zellen/cm² bei 37°C, 95% Luft und 5% CO₂ bei einem Mediumwechsel
10 alle 2 bis 3 Tage bis zur weitgehenden Konfluenz; dann Typisierung und Passagierung.

Zu den Figuren:

- 15 Figur 1: Aorta des Schweins nach Behandlung (Versuch entsprechend Schritten a) und b) des erfindungsgemäßen Verfahrens). Die Matrix ist aufgelockert und frei von Zellen. Die Zellentfernung erfolgte hier mit Trypsin.
- 20 Figur 2: Rasterelektronische Aufnahme der Oberfläche einer mit Trypsin entsprechend der Erfindung azellularisierten Oberfläche einer Aortenwand. Die Matrixfibrillen sind dargestellt.

25 Figur 3: Aorta des Schweins nach Besiedlung mit Endothelien, die einen Monolayer an der oberflächlichen Lumenseite bilden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines bioartifiziiellen Transplan-
tats für einen ausgewählten Empfänger, welches die folgenden

5 Schritte umfaßt:

a) Bereitstellung eines nativen, eine Collagen-Matrix enthal-
tenden allogenen oder xenogenen Gewebes bzw. Materials,

10 b) Entfernung weitgehend aller antigen-reaktiver Zellen aus
der Collagen-Matrix durch schonende Zellentfernung und an-
schließendes Spülen mit steriler wässriger Lösung,

15 c) direkte Weiterverarbeitung des zellfrei gemachten, durch
die Behandlung unter b) aufgelockerten Materials durch mög-
lichst vollständige Besiedlung mit den jeweils gewünschten
autologen Zellen des Empfängers oder mit genetisch modifi-
zierten für den Empfänger angepaßten Zellen,
wodurch ein unmittelbar einsatzbereites Transplantat erhalten
20 wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die
schonende Zellentfernung durch eine enzymatische Zellverdauung
geschieht, vorzugsweise durch Einlegen des Gewebes bzw. Materi-
25 als in Trypsin-Lösung.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die
schonende Zellentfernung mit Hilfe eines chemisch zellablösen-
den Mittels erfolgt, vorzugsweise mit Hilfe eines ionenspezifi-
30 schen Komplexbildners, wie EDTA oder EGTA.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekenn-
zeichnet, daß das Material zwischen Schritt a) und b) und/oder
zwischen Schritt b) und c) in isotonischer Lösung bei Kühlung
35 auf vorzugsweise 4°C und unter Zusatz von Antibiotika steril
zwischengelagert und/oder gegebenenfalls schonend sterilisiert
wird, vorzugsweise durch Begasen oder Bestrahlen, z.B. mit γ -
Strahlen, UV oder Protonen.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Besiedlung des Materials örtlich mit verschiedenen differenzierten autologen Zellen erfolgt, beispielsweise bei röhrenförmigen Gefäßen außen mit (Myo-) Fibroblasten und innen mit Endothelzellen.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Aufbringen der Zellen auf die Außenseite röhrenförmiger Gefäße mit Hilfe viskoser Flüssigkeiten erfolgt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß in die Matrix zusätzlich wenigstens ein Wachstumsfaktor, Matrixfaktor oder chemotaktischer Faktor eingebracht wird - vorzugsweise mit Hilfe der Zellen bei der Besiedlung, oder vor der Besiedlung durch Einbringen des Wachstumsfaktors in einer geeigneten Form in die extrazelluläre Matrix, oder nach der Besiedlung durch Einbringen des Wachstumsfaktors in die besiedelte Matrix.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß für die Besiedlung genetisch modifizierte Zellen verwendet werden, die mit Wachstumsfaktor(en) codierenden Genen transformiert bzw. transfiziert sind.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das erhaltene Transplantat für Lagerung und Transport steril unter nicht dehydrierenden Bedingungen gelagert wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das collagenhaltige allogene oder xenogene Gewebe bzw. Material Herzklappen, Haut, Gefäße, Aorten, Sehnen, Cornea, Knorpel, Knochen, Trachea, Nerven, Miniskus, Diskus intervertebralis, Ureteren, Urethra und Blase umfaßt.

11. Bioartifizielles empfangerspezifisches Transplantat, welches aus bereichsweise mit verschiedenen differenzierten autologen oder gentechnisch veränderten quasi-autologen Zellen besiedeltem interstitiellem Bindegewebe besteht, insbesondere er-
5 hältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
12. Transplantat nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein parenchymatöses Organ handelt.
- 10 13. Transplantat nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine bioartifizielle Herzklappe handelt, welche außen mehrschichtig mit (Myo-)Fibroblasten und innen mit Endothelzellen besiedelt ist, wobei die Oberflächen jeweils vollständig besiedelt sind, so daß dort weitgehend keine Collagen-
15 Matrix freiliegt.
14. Transplantat nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein Hauttransplantat handelt, welches außen (auf der körperabgewandten Seite) mit Keratinozyten und innen
20 (körperseitig) mit Zellen mesodermalen Ursprungs besiedelt ist, wobei die Oberflächen jeweils vollständig besiedelt sind, so daß dort überwiegend keine Collagen-Matrix freiliegt.

1/3

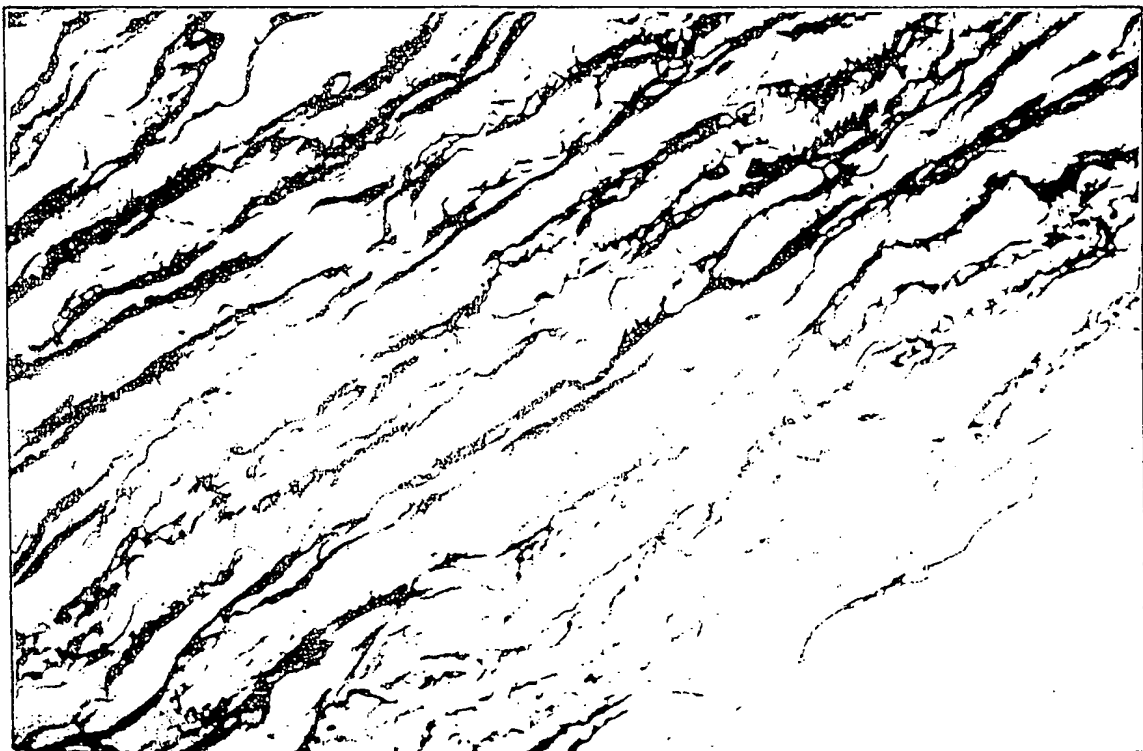


Fig.1

ERSATZBLATT (REGEL 26)

2/3

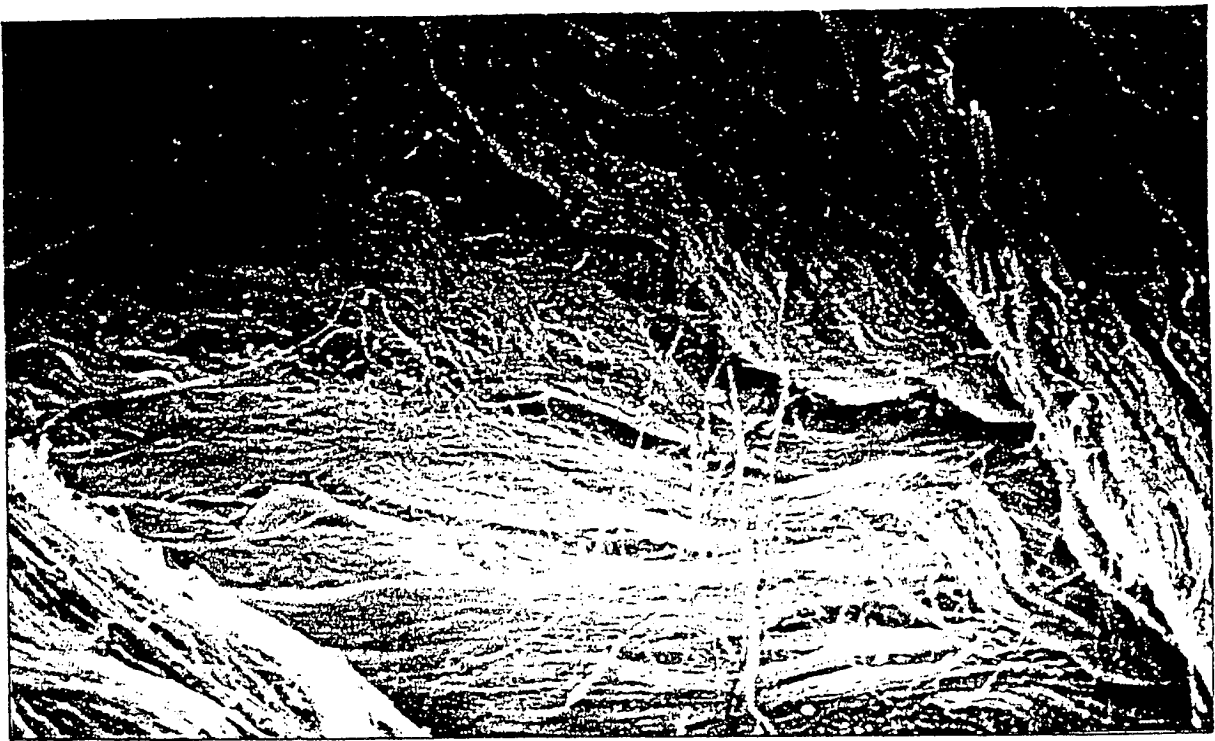


Fig. 2

ERSATZBLATT (REGEL 26)



Fig. 3

ERSATZBLATT (REGEL 26)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 98/01782

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61L27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 95 24873 A (CRYOLIFE INC) 21 September 1995 see page 9, line 1 - page 11, line 2 see page 11, line 23 - page 17, line 23 see page 20, line 12 - page 22, line 12 see page 23, line 5 - page 25, line 10 see page 28, line 9 - page 29, line 22; examples 1,5	1-4,7-12 5,13,14
X A	WO 96 08213 A (ADVANCED TISSUE SCIENCES INC) 21 March 1996 see page 3, paragraph 3 - page 7, paragraph 2 see page 14, paragraph 3 - page 17, paragraph 5; table 1	1-4,7-12 5,6,13, 14
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 March 1999

Date of mailing of the international search report

12/04/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gundlach, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/01782

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	<p>EP 0 564 786 A (LIFECCELL CORP) 13 October 1993 see page 3, line 33 - line 36 see page 3, line 53 - page 4, line 44 see page 5, line 22 - line 58 see page 6, line 12 - line 17 see page 6, line 31 - line 50 see page 7, line 28 - line 44 see page 8, line 6 - line 9; claims 1,5,7-11,24,28,31,33-35; examples 1,2,4,5 & US 5 336 616 A cited in the application</p>	1-14
A	<p>US 5 192 312 A (ORTON E CHRISTOPHER) 9 March 1993 see the whole document</p>	1-14
A	<p>EP 0 393 788 A (KOKEN KK) 24 October 1990 see examples 1,2,4</p>	1,11,13
A	<p>WO 96 32905 A (ST JUDE MEDICAL ;BISHOPRIC NANETTE H (US); DOUSMAN LINDA (US); YAO) 24 October 1996 see the whole document</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/01782

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9524873	A	21-09-1995	AU 1931495 A	03-10-1995
			EP 0871414 A	21-10-1998
			JP 9510108 T	14-10-1997
			US 5613982 A	25-03-1997
			US 5632778 A	27-05-1997
			US 5843182 A	01-12-1998
WO 9608213	A	21-03-1996	AU 700911 B	14-01-1999
			AU 3585595 A	29-03-1996
			AU 9521298 A	04-03-1999
			CA 2199810 A	21-03-1996
			EP 0781116 A	02-07-1997
			JP 10511563 T	10-11-1998
			NZ 293419 A	25-11-1998
EP 0564786	A	13-10-1993	US 5336616 A	09-08-1994
			AU 668703 B	16-05-1996
			AU 3293493 A	19-08-1993
			CA 2089336 A	13-08-1993
			JP 6261933 A	20-09-1994
US 5192312	A	09-03-1993	AU 1577792 A	06-10-1992
			CA 2105478 A	06-09-1992
			DE 69227103 D	29-10-1998
			DE 69227103 T	25-02-1999
			EP 0574527 A	22-12-1993
			ES 2122994 T	01-01-1999
			US 5772695 A	30-06-1998
			WO 9215259 A	17-09-1992
			US 5863296 A	26-01-1999
			US 5855617 A	05-01-1999
EP 0393788	A	24-10-1990	JP 2678945 B	19-11-1997
			JP 3198846 A	30-08-1991
			US 5171261 A	15-12-1992
			US 5387236 A	07-02-1995
WO 9632905	A	24-10-1996	AU 5564996 A	07-11-1996
			EP 0821573 A	04-02-1998
			US 5855620 A	05-01-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01782

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61L27/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 24873 A (CRYOLIFE INC) 21. September 1995	1-4, 7-12
A	siehe Seite 9, Zeile 1 - Seite 11, Zeile 2 siehe Seite 11, Zeile 23 - Seite 17, Zeile 23 siehe Seite 20, Zeile 12 - Seite 22, Zeile 12 siehe Seite 23, Zeile 5 - Seite 25, Zeile 10 siehe Seite 28, Zeile 9 - Seite 29, Zeile 22; Beispiele 1,5	5, 13, 14
X	WO 96 08213 A (ADVANCED TISSUE SCIENCES INC) 21. März 1996 siehe Seite 3, Absatz 3 - Seite 7, Absatz 2	1-4, 7-12
A	siehe Seite 14, Absatz 3 - Seite 17, Absatz 5; Tabelle 1	5, 6, 13, 14
	--- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. März 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

12/04/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gundlach, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01782

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>EP 0 564 786 A (LIFECCELL CORP) 13. Oktober 1993 siehe Seite 3, Zeile 33 - Zeile 36 siehe Seite 3, Zeile 53 - Seite 4, Zeile 44 siehe Seite 5, Zeile 22 - Zeile 58 siehe Seite 6, Zeile 12 - Zeile 17 siehe Seite 6, Zeile 31 - Zeile 50 siehe Seite 7, Zeile 28 - Zeile 44 siehe Seite 8, Zeile 6 - Zeile 9; Ansprüche 1,5,7-11,24,28,31,33-35; Beispiele 1,2,4,5 & US 5 336 616 A in der Anmeldung erwähnt ---</p>	1-14
A	<p>US 5 192 312 A (ORTON E CHRISTOPHER) 9. März 1993 siehe das ganze Dokument ---</p>	1-14
A	<p>EP 0 393 788 A (KOKEN KK) 24. Oktober 1990 siehe Beispiele 1,2,4 ---</p>	1,11,13
A	<p>WO 96 32905 A (ST JUDE MEDICAL ;BISHOPRIC NANETTE H (US); DOUSMAN LINDA (US); YAO) 24. Oktober 1996 siehe das ganze Dokument -----</p>	1

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01782

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9524873	A	21-09-1995	AU	1931495 A	03-10-1995
			EP	0871414 A	21-10-1998
			JP	9510108 T	14-10-1997
			US	5613982 A	25-03-1997
			US	5632778 A	27-05-1997
			US	5843182 A	01-12-1998
WO 9608213	A	21-03-1996	AU	700911 B	14-01-1999
			AU	3585595 A	29-03-1996
			AU	9521298 A	04-03-1999
			CA	2199810 A	21-03-1996
			EP	0781116 A	02-07-1997
			JP	10511563 T	10-11-1998
			NZ	293419 A	25-11-1998
EP 0564786	A	13-10-1993	US	5336616 A	09-08-1994
			AU	668703 B	16-05-1996
			AU	3293493 A	19-08-1993
			CA	2089336 A	13-08-1993
			JP	6261933 A	20-09-1994
US 5192312	A	09-03-1993	AU	1577792 A	06-10-1992
			CA	2105478 A	06-09-1992
			DE	69227103 D	29-10-1998
			DE	69227103 T	25-02-1999
			EP	0574527 A	22-12-1993
			ES	2122994 T	01-01-1999
			US	5772695 A	30-06-1998
			WO	9215259 A	17-09-1992
			US	5863296 A	26-01-1999
			US	5855617 A	05-01-1999
EP 0393788	A	24-10-1990	JP	2678945 B	19-11-1997
			JP	3198846 A	30-08-1991
			US	5171261 A	15-12-1992
			US	5387236 A	07-02-1995
WO 9632905	A	24-10-1996	AU	5564996 A	07-11-1996
			EP	0821573 A	04-02-1998
			US	5855620 A	05-01-1999